

УДК 576.893.161.13 : 595.79+577.113

© 1991

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДНК И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КАРИОТИПЫ У НИЗШИХ ТРИПАНОЗОМАТИД ИЗ КЛОПОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА СССР

С. А. Подлипаев, М. В. Филатов, Р. А. Пантина

Методами проточной цитофлуориметрии и импульсного ортогонального электрофореза были исследованы 16 изолятов низших трипанозоматид, относящихся к трем родам: *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Proteomonas*. Паразиты были выделены из 5 видов полужесткокрылых. Содержание ДНК в клетках всех исследованных изолятов сходно и составляет около  $1 \times 10^{-13}$  г на ядро. Клеточных популяций разной пloidности не обнаружено. Молекулярные кариотипы насчитывают от 9 до 12 хромосом размером от 240 до 1000 тыс. пар нуклеотидов. *Leptomonas nabiculae* и *L. occidentalis* отличаются по кариотипу от других исследованных изолятов.

При исследованиях сем. Trypanosomatidae основное внимание уделялось возбудителям заболеваний человека и животных. В последнее время все больший интерес вызывают так называемые низшие трипанозоматиды — паразиты беспозвоночных, в основном насекомых, и растений. Многообразие и широкая распространенность в природе, способность культивироваться и давать высокую численность, возможность применения микробиологических и генетических методов, непатогенность для человека делают низших трипанозоматид перспективными модельными объектами для экспериментальных исследований.

Малое количество и недостаточная информативность морфологических признаков клетки трипанозоматид заставляют искать новые таксономические критерии. Одним из перспективных критериев является структура кинетопластной ДНК. Сведения о ядерной ДНК в систематике низших трипанозоматид пока не применялись, однако известно, что содержание ДНК в клетке может служить характеристикой клеточных популяций, в том числе и у простейших и, в частности, у трипанозоматид (Dvorak, 1984). Одной из задач настоящего исследования было сравнение количества ДНК у нескольких видов и штаммов низших трипанозоматид, относящихся к разным родам, с целью выяснить возможность использования этого признака в систематике.

В настоящее время нет полной ясности в вопросе о пloidности трипанозоматид, хотя многие авторы склоняются в сторону признания их диплоидности (Tait, 1983). Запутанный вопрос о наличии или отсутствии полового процесса у трипанозоматид, по-видимому, решается в пользу наличия генетических обменов в этой группе животных (Крылов и др., 1985; Glassberg e. a., 1985), что стимулирует поиски клеточных популяций различной пloidности. Такие поиски являлись второй задачей представленной работы.

У представителей недавно описанного рода *Proteomonas*, характеризующегося своеобразным полиморфным жизненным циклом, было выделено несколько клонов, различающихся дискретными наследуемыми признаками (Подлипаев и др., 1990). Сравнительное исследование содержания ДНК в клонах

было другой задачей настоящего исследования. Была также проведена оценка абсолютного содержания ДНК.

Кариотип трипанозоматид вообще, и низших трипанозоматид в частности, почти не исследован. Решить вопрос о числе хромосом у трипанозоматид классическими методами, включая и электронную микроскопию, не удалось, что связано с постоянно деконденсированным состоянием хромосом у этих животных. Электрофоретические исследования кариотипа немногочисленны и фрагментарны (Райков, 1989). В настоящей работе нас интересовала возможность использования молекулярных кариотипов в систематике низших трипанозоматид.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы лабораторные культуры низших трипанозоматид из клопов (Hemiptera). Методы сбора насекомых, состав культуральной среды, способы выделения жгутиконосцев из кишечника хозяев и очистки культур от сопутствующих микроорганизмов описаны ранее (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987).

Характеристика исследованных культур приведена в таблице. Было изучено 16 изолятов паразитов, относящихся к 6 видам из 3 родов. Жгутиконосцы выделены из 5 видов насекомых, входящих в 3 семейства. Насекомые-хозяева происходят из разных точек Северо-Запада СССР. Все культуры получены и хранятся в лаборатории протозоологии ЗИН АН СССР.

Помимо культур трипанозоматид, выделенных из природы, были использованы клоны, маркированные наследуемыми признаками морфологии клеток и формы колоний на твердой питательной среде (Подлипаев и др., 1990). Для *Proteomonas breviculae* эти клоны обозначены: NBr — общая исходная культура, NBrA — клон образует крупные колонии и NBrB — мелкие колонии. Для *P. inconstans*: ZK — общая культура, ZKA, ZKB, ZKM — клоны, образующие амебодные, крупные и мелкие колонии соответственно.

Культуры трипанозоматид, используемые в работе  
Cultures of trypanosomatids used in the paper

Систематическое положение изолятов	Условное обозначение изолятов	Насекомое-хозяин Hemiptera	Место и время выделения культуры
<i>Blastocrithidia gerricola</i>	KVI	сем. Gerridae <i>Gerris lacustris</i>	Калининградская обл., Куршская коса, 28.07.1981
<i>Blastocrithidia</i> sp.	B 10	Тот же	Карельская АССР, губа Чупа, мыс Картеш, 03.09.1986
<i>Leptomonas nabiculae</i>	d 2, d 4	Сем. Nabidae <i>Nabicala flavomarginata</i>	Ленинградская обл., пос. Белоостров, 17.08.1982
<i>Leptomonas occidentalis</i>	N 2	Тот же	Калининградская обл., Куршская коса, 26.07.1981
<i>Leptomonas peterhoffi</i>	101	»	Ленинград, Старый Петергоф, 29.07.1980
<i>Leptomonas</i> sp.	F 5, F 6	»	Карельская АССР, губа Чупа, мыс Картеш, 09.09.1986
<i>Leptomonas</i> sp.	NV	<i>Nabicala limbata</i>	Ленинград, Старый Петергоф, 26.08.1982
<i>Proteomonas breviculae</i>	NBr, NBrA, NBrB	<i>Nabis brevis</i>	Псковская обл., пос. Ляды, 23.03.1986
<i>Proteomonas inconstans</i>	ZK, ZKA, ZKB, ZKM	Сем. Miridae <i>Leptoterna dolabrata</i>	Псковская обл., пос. Ляды, 23.07.1985

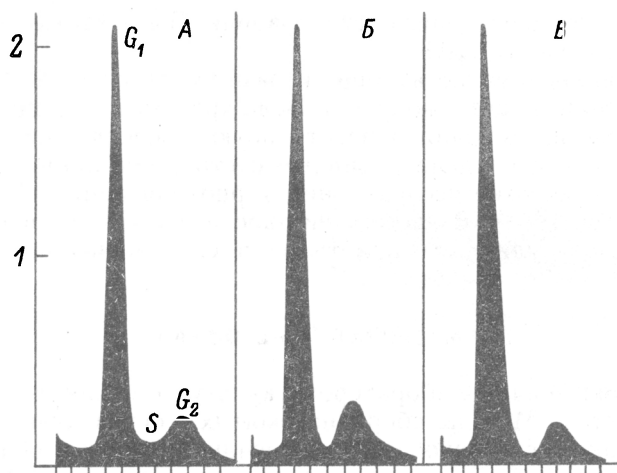


Рис. 1. Распределение клеток *Proteomonas inconstans* (А), *Leptomonas nabiculae* (Б) и *Blastocrithidia gerricola* (В) по количеству ДНК.

По оси абсцисс — содержание ДНК в условных единицах (каналы анализатора флуоресценции); по оси ординат — количество клеток с данным содержанием ДНК (в тысячах). G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, S — фазы клеточного цикла: пресинтетическая, синтетическая и постсинтетическая соответственно.

Fig. 1. The spread of the cells of *Proteomonas inconstans* (A), *Leptomonas nabiculae* (B) and *Blastocrithidia gerricola* (B) according to DNA content.

В экспериментах использовались культуры на 5-й день после пересева, при численностях паразитов  $10^7$ — $10^8$  клеток/мл. Опыты проводились в трех повторностях.

Метод проточной цитофлуориметрии состоит в том, что окрашенные специфичным к ДНК флуоресцентным красителем клетки поштучно направляются по капилляру в область, на которую сфокусирован источник света — аргонный лазер или ртутная лампа (Steen, Lindmo, 1979). Возникающий импульс флуоресценции регистрируется фотоумножителем, преобразуется в электрический сигнал и анализируется. Информация выдается в виде распределения клеток

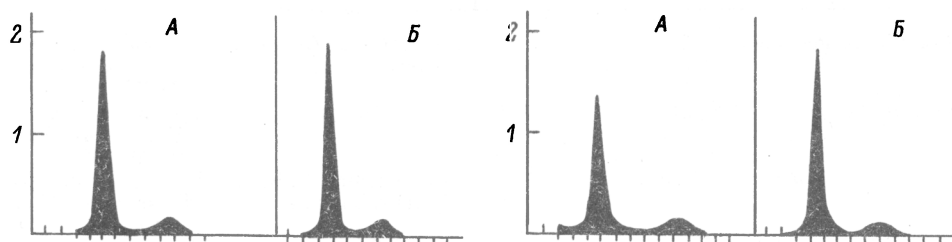


Рис. 2. Распределение клеток *Blastocrithidia* sp. (А) и *Blastocrithidia gerricola* (Б) по количеству ДНК.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. The spread of the cells of *Blastocrithidia* sp. (A) and *Blastocrithidia gerricola* (B) according to DNA content.

Рис. 3. Распределение клеток *Proteomonas inconstans* по количеству ДНК, клоны NBrB (А) и NBrA (Б).

Обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 3. The spread of the cells of *Proteomonas inconstans* according to the content of DNA, clone NBrB (A) and NBrA (B).

по интенсивности флуоресценции, которая пропорциональна содержанию ДНК в клетке.

Приготовление образцов для измерений заключалось в следующем: клетки ресуспендировались в фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 150 миллимолей NaCl и 10 миллимолей ЭДТА, 0.1%-ный неионный детергент тритон X-100, РНК-азу в количестве 200 мкг/мл и флуоресцентный краситель этидиум бромид (ЭБ) 10 мкг/мл — при анализе с помощью аргонового лазера (рис. 1) или диаминофенилиндола (ДАФИ) 2 мкг/мл — при использовании ртутной лампы (рис. 2, 3). В результате такой обработки разрушается наружная мембрана клетки и цитоплазматические структуры, в то время как ядра остаются интактными. Контроль проб с помощью флуоресцентного микроскопа подтвердил отсутствие в них каких-либо иных, кроме ядер, ДНК-содержащих структур, что представляется существенным, так как в кинетопласте трипанозом содержится значительное количество ДНК.

Полученные результаты были одинаковы для обоих использованных красителей и источников излучения.

Изменения выполнялись на оригинальных моделях проточных цитофлуориметров, разработанных в Ленинградском институте ядерной физики им. Б. П. Константинова.

Для электрофореза клетки ресуспендировались в буфере (трис-HCl 10 миллимолей, pH 7.5, NaCl 75 миллимолей, ЭДТА 75 миллимолей), смешивались с равным объемом расплавленной (37°) легкоплавкой агарозы, приготовленной на том же буфере, и заливались в специальную форму. После застывания агарозы образцы помещались в лизирующий раствор (0.5 молярная ЭДТА, трис-HCl 10 миллимолей, pH 9.0, протеиназа К 100 микрограмм на мл) и лизировались сутки при 50°. Затем образцы помещались в лунки 1%-го агарозного геля.

Импульсный ортогональный электрофорез проводился в обычном трис-боратном буфере при переменном режиме: первые 17 ч при напряжении 100 В с импульсом переключения поля 50 сек; последующие 6 ч при напряжении 110 В с импульсом 110 сек.; далее 17 ч при 80 В в течение 140 сек. Переключение поля проводилось под углом 120°. Конструкция прибора позволяет достигать равномерности поля и получать прямые параллельные дорожки. Термостатирование проводилось с точностью до 1°, что критично для качества разделения хромосом. Электрофореграммы окрашивались этидиум бромидом. В качестве маркеров использовались хромосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с известным молекулярным весом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение содержания ДНК в ядрах исследованных изолятов демонстрирует два пика, соединенных перешейком клеток с промежуточным содержанием ДНК (рис. 1—3). Полученную картину можно интерпретировать следующим образом: положение первого, большого пика соответствует содержанию ДНК в клетках, находящихся в G<sub>1</sub> фазе клеточного цикла, положение этого пика и есть мера размера генома данного изолята. Перешеек соответствует клеткам, синтезирующим ДНК в фазе S, а второй пик — клеткам с удвоенным содержанием ДНК в фазе G<sub>2</sub>.

Из полученных данных следует, что с точностью измерений, определяемой коэффициентом вариации пика флуоресценции клеток, находящихся в фазе G<sub>1</sub>, который составил от 5 % до 10 %, можно утверждать, что все изученные изоляты обладают очень близким содержанием ДНК.

Для оценки абсолютного количества ДНК была сопоставлена интенсивность флуоресценции клеток трипанозоматид с таковой лимфоцитов крысы. Последние обладают в 29 раз большим содержанием ДНК, чем ядра *Blastocrithidia gerri-*

cola. Зная содержание ДНК в ядрах лимфоцитов крысы ( $3 \times 10^{-12}$  г) можно оценить количество ДНК на ядро у исследованных низших трипанозоматид, как близкое к  $1 \times 10^{-13}$  г.

Все исследованные изоляты, независимо от их систематической принадлежности и географического происхождения, демонстрируют удивительное однообразие по количеству ДНК в ядрах. Содержание ДНК как у представителей разных родов (рис. 1), так и разных видов в роде (рис. 2) и штаммов внутри вида (рис. 3) очень близко друг к другу и стабильно внутри каждой группы.

Изложенные факты свидетельствуют об отсутствии процессов, дестабилизирующих содержание ДНК в клетке низших трипанозоматид, что особенно интересно в связи с продолжающейся дискуссией о наличии генетических обменов у этих паразитов.

Постоянство содержания ДНК у разных изолятов, вероятно, не является общим правилом для всех трипанозоматид. Так, штаммы *Trypanosoma cruzi* разного происхождения могут отличаться по этому признаку (Dvorak, 1984). Представляет существенный интерес, что и по данному признаку, как и по ряду других (особенностям жизненных циклов, паразито-хозяйным отношениям и, вероятно, организации генетических систем) низшие трипанозоматиды (паразиты беспозвоночных и растений) отличаются от высших (паразитов позвоночных и беспозвоночных), что может свидетельствовать о различных путях эволюции двух ветвей представителей сем. Trypanosomatidae.

Полученные данные позволяют считать, что в пределах точности метода исследованные культуры трипанозоматид обладают одинаковой ploidy.

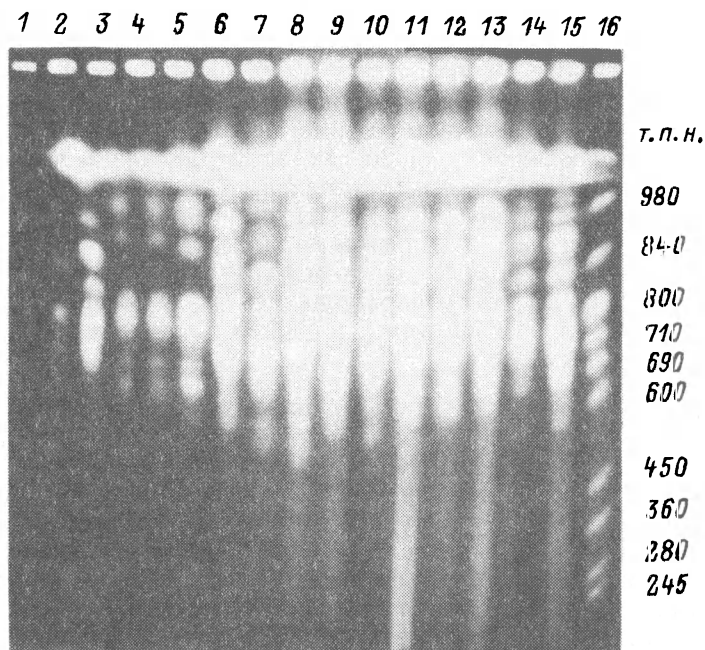


Рис. 4. Молекулярные кариотипы исследованных изолятов низших трипанозоматид.

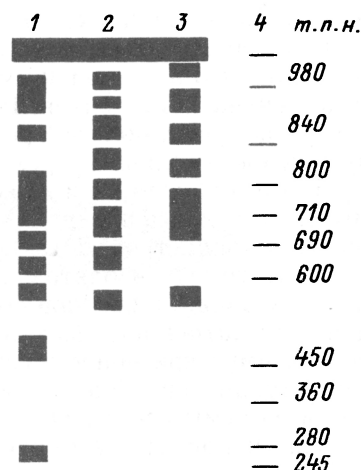
1 — маркер (хромосомы дрожжей); 2 — *Blastocrithidia gerricola* (изолят KVI); 3 — *Leptomonas occidentalis* (N 2); 4 — *L. nabiculae* (d 2); 5 — *L. nabiculae* (d 4); 6 — *L. peterhoffi* (101); 7 — *Leptomonas* sp. (NV); 8 — *Leptomonas* sp. (F 5); 9 — *Leptomonas* sp. (F 6); 10 — *Blastocrithidia* sp. (B 10); 11 — *Proteomonas inconstans* (ZKM); 12 — *P. inconstans* (ZKA); 13 — *P. inconstans* (ZKB); 14 — *P. breviculae* (NBrA); 15 — *P. breviculae* (NBrB); 16 — маркер (хромосомы дрожжей). Числа по вертикали — размеры маркерных хромосом в тысячах пар оснований (т.п.н.).

Fig. 4. Molecular karyotypes of the investigated isolates of lower trypanosomatids.

Рис. 5. Схематическое изображение типичных молекулярных кариотипов.

1 — *Leptomonas nabiculae*; 2 — *Proteomonas breviculae*; 3 — *Blastocrithidia gerricola*; 4 — хромосомы дрожжей (маркер).

Fig. 5. Diagrammatic representation of typical molecular karyotypes.



Сходство общего содержания ДНК в различных изолятах и клонах не предполагает идентичной организации их геномов. Для выявления возможных различий были проанализированы несколько изолятов и клонов методом ортогонального импульсного электрофореза (Birgen e. a., 1988). Данный метод позволяет визуализировать хромосомы трипанозоматид, что другими способами сделать не удастся. При общем сходстве распределения хромосом по размерам, между изолятами имеются явные различия, определяемые наличием или отсутствием тех или иных полос на фореграммах.

В разных изолятах можно идентифицировать от 7 до 9 полос размером от 250 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) до 1000 т. п. н. Помимо этого, имеется значительное количество ДНК-содержащего материала в виде яркой полосы с подвижностью в геле, соответствующей размеру ДНК больше 1000 т. п. н. (рис. 4, 5). Интерпретация этой полосы низкоподвижной ДНК пока затруднена. В ней могут находиться хромосомы большего, чем 1000 т. п. н., размера, не разрешаемые в данных условиях электрофореза. Не исключено нахождение в этой зоне геля ДНК с аномальной подвижностью, в частности сцепленных колец ассоциата кинетопластной ДНК.

Поскольку фореграммы демонстрируют полосы, сильно различающиеся по яркости, то можно полагать, что наиболее яркие полосы соответствуют нескольким хромосомам одного размера. Тем самым истинное количество разрешенных хромосом должно превышать число полос и, по нашим оценкам, составляет 9—12 для разных изолятов.

Известно наличие у трипанозоматид разного числа так называемых минихромосом размером 50—100 т. п. н. (Райков, 1989). Возможно, что отсутствие низкомолекулярных ДНК в наших экспериментах связано с тем, что мы анализировали лишь ДНК более высокого молекулярного веса и при использованном режиме электрофореза минихромосомы покидали гель.

Кариотип изолятов трипанозоматид, исследуемых в настоящей работе, требует более подробного изучения. Однако и полученные первые данные позволяют сделать выводы, значимые для систематики этой группы.

По картинам кариотипов наиболее четко выделяются три изолята, относящиеся к роду *Leptomonas*: *L. nabiculae* (изоляты d2 и d4) и *L. occidentalis* (N 2), имеющие по сравнению с остальными две особенности — добавочные небольшие хромосомы размером около 450 т. п. н. и 280 т. п. н. и отсутствие хромосомы с размером между 800 и 840 т. п. н. (рис. 4, 5). Эти изоляты выделены из одного хозяина — *Nabacula flavomarginata*. Заметим, что *L. peterhoffi*, выделенный из того же хозяина и в близком пункте, отличается по кариотипу от первых трех изолятов.

Другие исследованные изоляты характеризуются менее значительными, хотя и явными, отличиями, требующими дальнейшего изучения.

Недавно нами был проведен рестрикционный анализ строения кинетопластной ДНК той же коллекции изолятов трипанозоматид, что и используемой в настоящей работе (Kolesnikov e. a., 1990). Вызывает большой интерес, что

и по размеру миниколец (1.75 т. п. н.) и по рестрикционному спектру расщепления максикольцевых молекул кинетопластной ДНК выделяется та же группа изолятов, что и по молекулярным кариотипам — *L. nabiculae* и *L. occidentalis*. Еще раньше (Подлипаев, 1985) было отмечено, что эти виды входят в группу северных представителей рода *Leptomonas* из клопов сем. Nabidae, характеризующихся небольшими размерами.

Таким образом, можно констатировать, что совершенно разные и независимые друг от друга признаки — морфологические, организации кариотипа, строения кинетопластной ДНК — дают совпадающие результаты и выделяют одну и ту же группу изолятов. Это говорит, с одной стороны, о перспективности использования признаков организации ядерного и митохондриального геномов для систематики низших трипанозоматид. С другой стороны, выделение по ряду независимых критериев групп видов, не совпадающих с традиционным делением сем. Trypanosomatidae на роды, свидетельствует о недостаточной разработанности системы семейства.

Так, например, размер миниколец кинетопластной ДНК скорее всего является групповым, надвидовым признаком (Kolesnikov et al., 1990). То, что и по этому критерию, и по молекулярным кариотипам дифференцируется одна и та же группа изолятов, вероятно, свидетельствует о необходимости повышения таксономического статуса видов, образующих эту группу.

Для целей систематики низших трипанозоматид, применительно к исследованным в настоящей работе изолятам, использование сравнения таксонов родовой или видовой групп по признаку количества ДНК в ядре, вероятно, неперспективно. Напротив, анализ молекулярных кариотипов свидетельствует о перспективности использования данного критерия в систематике сем. Trypanosomatidae.

#### Список литературы

- Крылов М. В., Самовар А. Г., Подлипаев С. А., Хаецкий А. С. Исследование наличия генетического обмена в жизненном цикле *Crithidia oncopelti* (Protozoa, Kinetoplastida) // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1985. Т. 129. С. 4—25.
- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипанозоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1985. Т. 129. С. 35—47.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 545—552.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. *Proteomonas inconstans* nov. gen., nov. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera, Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24. Вып. 4. С. 339—346.
- Райков И. Б. Ядерный геном простейших // Организация генома. 1989. М.: Наука. С. 110—154.
- Birgen B. W., Lai E., Clark S. M., Siman M. I. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA // Nuclear Acid Research. 1988. Vol. 16. N 5. P. 7563—7582.
- Dvorak J. A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications // J. Cell. Biochem. 1984. Vol. 24. P. 357—371.
- Glassberg J., Miyazaki I., Rifkin M. R. Isolation and partial characterization of mutants of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* and their use in detecting genetic recombination // J. Protozool. 1985. Vol. 32. P. 118—125.
- Steen H. B., Lindmo T. Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone // Science. 1979. Vol. 204. P. 403.
- Tait A. Sexual processes in the kinetoplastida // Parasitology. 1983. Vol. 86. P. 29—57.

ЗИН АН СССР, Ленинград

Поступила 19.06.1990

A COMPARATIVE DETERMINATION OF DNA-CONTENT IN THE LOWER TRYPANOSOMATIDS  
FROM HEMIPTERA OF NORTH-WEST OF THE USSR

S. A. Podlipaev, M. V. Phylatov, K. A. Pantina

*Key words:* Trypanosomatidae, Hemiptera, flow cytometry, ortogonal-field-alternation gel electrophoresis, DNA-content, molecular caryotypes

S U M M A R Y

A relative DNA-content of the nuclei of 16 isolates of the lower trypanosomatids was studied by the flow cytometry method. The trypanosomatids were attributed to 6 species of 3 genera : *Blastocrithidia*, *Leptomonas* and *Proteomonas*. The parasites have been isolated from 5 species of insects belonging to 3 families of Hemiptera. The DNA-content in the cells of all examined isolates, including the cells of the clones of the same species, altered no more than 10 %. The cell populations with different ploidy were not found. Molecular caryotypes consist of 9 to 12 chromosomes, each chromosome being from 240 to 1000 kilobases in size. The caryotype of *L. occidentalis* and *L. habriculae* differs from all isolates investigated earlier.

---